

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA TEADUSKOND  
ARENGUBIOLOOGIA ÕPPETOOL

Jaanus End

***Drd1a* ekspressioon kana (*Gallus gallus domesticus*) otsajus**

Bakalaureusetöö

PhD Kersti Lilleväli

MSc Triin Tekko

TARTU 2014

## SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID .....	3
SISSEJUHATUS .....	4
1. VALDKONNA ÜLEVAADE .....	5
1.1. Dopamiini retseptorid, nende struktuur ja funktsioon. ....	5
1.2. <i>Drd1a</i> geen ja valk, selle teadaolevad funktsioonid .....	6
1.3. <i>Wfs1</i> geen ja valk, selle ehitus ja teadaolevad funktsioonid .....	7
1.4. Tetrapoodide otsaju ehitus .....	8
1.4.1. Tetrapoodide otsaju .....	8
1.4.2. Ajukoor .....	8
1.4.3. Hipokampus .....	9
1.4.4. Striatum ehk juttkeha .....	9
1.4.5. Amügdala ehk mandelkeha .....	10
2. Eksperimentaalne osa .....	12
2.1. Eksperimentaalse töö eesmärgid .....	12
2.2. Materjal ja metoodika .....	12
2.2.1. Kana <i>Drd1a</i> cDNA fragmendi klonimine .....	12
2.2.2. Kana <i>Drd1a</i> RNA proovi süntees ja eelnevad etapid .....	14
2.2.3. Kana aju materjali töötlemine .....	15
2.2.4. <i>In situ</i> hübridisatsioon Dig-märgistatud riboprooviga vabalt ujuvatele kana aju lõikudele .....	16
2.2.5. Mikroskoopia ja pilditöötlus .....	16
2.3. Tulemused .....	17
2.3.1 <i>Drd1a</i> ekspressioon kana ( <i>Gallus gallus domesticus</i> ) otsajus .....	17
2.4. Arutlus .....	22
KOKKUVÕTE .....	24
Summary .....	25
TÄNUSÕNAD .....	26
KIRJANDUSE LOETELU .....	27

## KASUTATUD LÜHENDID

AC8 – adenülaadi tsüklaas 8

cAMP – tsükliline adenosinmonofosfaat

D1A – dopamiini retseptor 1a valk

dNTP – desoksüribonukleotiidide segu

*Drd1a* – dopamiini retseptor 1a geen

ER – endoplasmaatiline retiikulum

GDP – guanosiidifosfaat

GTP – guanosintrifosfaat

IPTG – isopropüül-beta-D-tiogalaktopüranosiid

GABA – gamma-aminovõihape

HVC – kõrgem laulukontrolli keskus (*higher vocal centre*)

MQ – filtreeritud ja deioniseeritud vesi

NMDA – N-metüül-D-aspartaat

NTMT – 100 mM Tris-HCl pH 9,5; 100 mM NaCl; 50 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,1% Tween20 lahus

PBS – naatriumfosfaat-puhverdatud soolalahus

PFA – paraformaldehüüd

PKA – proteiinkinaas A

SDS – naatriumdodetsüülsulfaat

SSC – naatriumtsitraat-puhverdatud soolalahus

TAE – Tris-atsetaat-EDTA puhver

TBST – Tris-puhverdatud soolalahus ja Tween20

*Wfs1* – Wolframi sündroom 1 geen

X-Gal – 5-bromo-4-kloro-3-indolüül-beta-D-galaktopüranosiid

## SISSEJUHATUS

Dopamiinergiline süsteem moodustab erinevate selgroogsete kesknärvisüsteemis laialdase leviku ja mõjuga neuraalse juhtetee. See osaleb emotsioonide ja motivatsiooni tekitamisel ning reguleerib liigutuste sujuvust. Dopamiinergilisse süsteemi on otsaju struktuuridest enim kaasatud striatum, amügdala, haisteköbrike ja hipokampus. Dopamiini retseptoritest levinuim on D1A, mida leidub kõigis selgroogsetes.

Volframiini roll on muuhulgas rakkudes endoplasmaatilise stressi kahjulike mõjude ärahoidmine. Närilise ajus ekspresseerub *Wfs1* paljudes piirkondades, kuhu jõuavad dopamiinergilised juhteteed: hipokampuses, mandelkehas, dorsaalses ja ventraalses juttkehas, ajukoores. Kuna meie töörühmas on käsil *Wfs1* ekspressiooni kirjeldamine kodukana (*Gallus gallus domesticus*) otsajus, kirjeldati käesoleva töö käigus dopamiini retseptor 1A-d kodeeriva *Drd1a* geeni ekspressioon.

Töö eesmärgid:

1. Anda kirjanduse põhjal ülevaade D1A ja *Wfs1* funktsioonidest ja ekspressioonist imetaja ajus.
2. Võrrelda imetaja ja linnu otsaju ülesehitust.
3. Määrata *Drd1a* ekspressioon täiskasvanud ja arenevas kodukana (*Gallus gallus domesticus*) otsajus ja võrrelda seda *Wfs1* ekspressiooniga.

## 1. VALDKONNA ÜLEVAADE

### 1.1. Dopamiini retseptorid, nende struktuur ja funktsioon.

Dopamiin on neurotransmitter, mis osaleb mootorikas, motivatsioonis ja mälu kujundamisel (Wise, 2004). Dopamiin vabastatakse dopamiinergiliste neuronite presünaptilistest terminalidest ja see seondub erinevate pre- ja postsünaptiliste dopamiini retseptoritega (Kebabian ja Calne, 1979). Dopamiinergilised neuronid on keskaju mustolluses, ventraalses tegmentaalses piirkonnas ja hüpotaalamuses. Mustolluse dopamiinergilised neuronid innerveerivad striatumit, moodustavad nigrostriataalse juhtetee ja on seotud rottide uuriva käitumisega (Alttoa jt., 2009). *Nucleus accumbens*'isse ja aju kortikaalsetesse piirkondadesse suubuvad ventraalse tegmentaalse piirkonna neuronid ja need moodustavad mesolimbokortikaalse juhtetee, mis on seotud meeldivate stiimulite kinnistava efektiga. (Di Chiara ja Imperato 1988; Rebec ja teised, 1997). Hüpotaalamuses reguleeritakse prolaktiini sekretsiooni anterioorsest ajuriptsist, selle protsessiga on seotud tuberoinfundibulaarne juhtetee (Lechan ja teised, 1980; MacLeod, 1976).

Dopamiini retseptoritel on seitse transmembraanset domääni ja need kuuluvad G valguga paardunud retseptorite rodopsiini perekonda (Probst jt, 1992; Ellis, 2004) (joonis 1). Dopamiini retseptorid on jaotatud kahte perekonda: D1 ja D2. D1 perekonda kuuluvad D1A (nimetatakse ka D1), D1B (nimetatakse ka D5), D1C ja D1E. D2 perekonda kuuluvad D2, D3 ja D4 retseptorid (Missale jt, 1998; Yamamoto jt, 2012). Dopamiini retseptorite ühine eelkäija oli eeldatavasti seitsme transmembraanse domääniga. Geeni dubleerimine andis aluse kahe eri perekonna tekkeks. Edasised duplikatsioonid võimaldasid subtüüpidel tekkida mõlema perekonna siseselt. Kahel eri perekonnal kujunes välja eripärane dopamiini sidumise spetsiifika. (Callier jt, 2003; Yamamoto jt, 2012).

D1 perekonna geenidel puuduvad intronid, seevastu D2 perekonnal on intronid olemas. D1 ja D2 retseptorid on fülogeneetiliselt lähedased pigem teistele monoamiinsetele retseptoritele kui teineteisele (Callier jt, 2003).

D1A, D1B ja D2 on evolutsiooniliselt vanemad ja laiemalt levinud võrreldes ülejäänud dopamiini retseptoritega. D1C ja D3 on evolutsiooniliselt nooremad (Yamamoto jt, 2012).

*D1A* on dopamiini retseptoritest enim konserveerunud ja esineb terves selgroogsete hõimkonnas. Selle konserveeritust väljendavad kodeerivate järjestuste, rakulise funktsiooni ja ekspressioonimustri konserveeritus striatumis. (Yamamoto jt., 2012; Marin jt., 1998; Reiner jt., 1998).

Imetajatel ja osadel lindudel puudub *DIE* geen. Tõenäoliselt oli see olemas tüviamniootidel ning kadus imetajate eellastel ning osadel lindudel. Sauropsiidide ja imetajate D1C retseptorid on evolutsiooni käigus teineteisest piisavalt divergeerunud, et näidata erinevat farmakoloogilist profiili (Yamamoto jt., 2012).

Luukaladel on D1A, D1B ja D1C retseptoritel paralooigid. Need paralooigid on tekkinud ilmselt geenide duplitseerumise tulemusena (Yamamoto jt., 2012).

D1 retseptorid aktiveerivad ja D2 retseptorid inhibeerivad neuraalset aktiivsust ja adenülaadi tsüklaasi (Stoof ja Keabian, 1984; Gerfen, 2000). D2 retseptorite afiinsus on kõrgem ja passiivse oleku taastumine pärast stimulatsiooni lõppemist aeglasem kui D1 retseptoritel (Kubikova jt., 2010).

Liigutamise intensiivsust kontrollitakse ventraalses striatumis D1A, D2 ja D3 retseptorite aktivatsiooni vahendusel. D1 retseptorite puudulikkus tekitab hiirtel hüperaktiivsust. D2 retseptorite puudulikud hiired on vähenenud liikumisega (Missale jt., 1998). D2 autoretseptorid paiknevad dopaminergiliste juhteteede presünaptilistes membraanides. Kui dopamiini vabastamisel sünaptilisse pilusse see seotakse D2 autoretseptorite poolt, siis liikumine on pärsitud (Jackson ja Westlind-Danielsson, 1994). Kui postsünaptilised D2 retseptorid seovad dopamiini, siis need stimuleerivad D1A kaasmõjul maksimaalse intensiivsusega liikumist (Missale jt., 1998). D1A ja D2 vahendavad dopamiini mõju õppimisele ja mälule. Mõlema retseptori aktiveerimine roti hipokampuses parandab operatiivse mälu tööd ja teadmiste säilitamist (Missale jt., 1998).

D1A, D1B, D1C, D2 ja D3 avalduvad laululinnu aju laulutuumades (Kubikova jt., 2010). VTA-SNc innerveerib laulutuumas LArea X. Tugeva innervatsiooni korral aktiveeruvad D2 retseptorid, mis inhibeerivad *egr1* geeni. D1 retseptorid aktiveeruvad nõrgema innervatsiooni korral ja aktiveerivad *egr1* ekspressiooni. Täiskasvanud isase kana suurajus on olemas laulutuumad, milles puudub eristatav dopamiini retseptorite ekspressioon, sest kana ei ole vokaalne õppija (Kubikova jt., 2010).

## 1.2. *Drd1a* geen ja valk, selle teadaolevad funktsioonid

*Drd1a* geen asub kana genoomis 13. kromosoomis. Geeni pikkus on 1800 aluspaari. Selle produkt D1A retseptor reguleerib rakusisest kaltsiumikontsentratsiooni. D1A aktiveerib fosfolipaas C, mis omakorda stimuleerib fosfatidüülinositooli hüdrolyüsi. Tekkinud inositol 1,4,5-trisfosfaat võimaldab välises keskkonnas paikneval kaltsiumil liikuda tsütoplasmasse



2003). Volframiini kodeerib geen *Wfs1*. WFS1 puudulikkus põhjustab inimesel autosomaalset retsessiivset haigust Wolfram'i sündroomi. Sündroom on tuntud ka akronüümi DIDMOAD (*Diabetes Insipidus, Diabetes Mellitus, Optic Atrophy, Deafness*) all, mis on tuletatud põhiliste sümptomite nimedest (Inoue jt., 1998). Sündroom on neurodegeneratiivne, retsessiivselt päranduv autosomaalne haigus. Patsientidel avalduvad tõsised psühhiaatrilised häired, põie funktsioneerimise häired ning on tuvastatud üldist peaaaju atroofiat. Wolfram'i sündroomiga inimestel on täheldatud kalduvus depressioonile, bipolaarsele häirele, ärevushäiretele ja enesetapukatsetele (Swift ja Swift, 2005; Koido jt., 2005). Wolframi sündroomiga patsientide keskmine eluiga on 30 aastat (Rigoli jt., 2011).

*Wfs1* avaldub tugevalt südames, kõhunäärme  $\beta$ -rakkudes, kopsudes, platsentas ja ajus (Inoue jt., 1998). Täiskasvanud hiire ajus avaldub *Wfs1* tugevalt ajukoore teatud piirkondades (mediaalne, frontaalne ja temporaalne koor), septumi lateraalses tuumas, juttkehas (*nucleus accumbens* ja haistekõbruke), tsentraalses laiendatud mandelkehas, hipokampuses, *parasubiculum*'is ja kraniaalnärvide tuumades (Luuk jt., 2008).

*Wfs1* on üheksa ER-i membraani läbivat domeeni, selle N-terminaalne ots paikneb tsütoplasmaatilisel ja C-terminaalne ots ER-i luumeni poolisel küljel (Hofmann jt., 2003; Takeda jt., 2001). WFS1 osaleb ER stressi signaliseerimises, surub alla ER stressi vastust ja hoiab ära raku surma (Fonseca jt., 2010). WFS1 aktiveerib katioonset kanalit ER'i membraanis (Osman jt., 2003) ja reguleerib  $\text{Ca}^{2+}$  taset ER'i luumenis (Takei jt., 2006).

#### 1.4. Tetrapoodide otsaju ehitus

##### 1.4.1. Tetrapoodide otsaju

Otsaju on kaladel, kahepaiksetel, roomajatel, lindudel ja imetajatel jaotatud kolmeks piirkonnaks: pallium ehk mantel, striatum ehk juttkeha ja pallidum ehk kahvakeha (Jarvis jt., 2005; Reiner jt., 2004). Juttkeha ja pallidum kokku moodustavad otsaju basaalosa, nende kohta on käibel nimetus „basaalganglionid” (Smith-Fernández jt., 1998).

##### 1.4.2. Ajukoor

Kuuekihiline neokorteks ja isokorteks on imetajatel hilises evolutsioonis välja kujunenud ning puudub lindudel (Smith-Fernández jt., 1998). Imetajate ajukoor reguleerib taju, annab motoorseid käske, võimaldab ruumilist mõtlemist ja on keele ning haistmise keskuseks (Kaas, 2012).



#### 1.4.3. Hipokampus

Imetajatel jaguneb hipokampus kaheks piirkonnaks: *gyrus dentatus* ehk hammaskäär ja *cornu ammonis* ehk Ammoni sarv. Ammoni sarv jaguneb püramidaalrakkude suuruse järgi CA1, CA2, CA3 ja CA4 alapiirkondadeks (Andresen jt., 2007).

Lindude hipokampuse kompleks asetseb otsaju dorsomediaalses osas ning jaguneb kaheks: mediaalne hipokampus ja sellega külgnev parahipokampus (Karten ja Hodos, 1967). Lindude hipokampuse kompleks on homoloogne imetajate hipokampusega (Casini jt., 1997; Colombo ja Broadbent, 2000).

Nii imetajate kui ka lindude hipokampusesse projitseerivad neuronid taalamusest, hüpotaalamusest ja *locus coeruleus*'est (Casini jt., 1986; Krayniak ja Siegel, 1978; Krebs jt., 1991). Imetaja ja linu hipokampus on tihedalt seotud entorinaalkorteksiga (Canto jt., 2008). Hipokampus on osa limbilisest süsteemist (LeDoux, 2000). Imetajatel hammaskäär osaleb uute mälestuste eristamisel vanadest, võimendades entorinaalsest korteksist lähtuvaid närvisignaale (Treves jt., 2008). Hipokampus osaleb imetajate ruumilise mälu tekitamises. Lindudel osaleb ruumilise mälu talletamises hipokampuse kompleks (Vargas, 2004). Navigatsiooni kaardi kinnistamisel on rändavate lindude hipokampusel oluline roll (Gagliardo jt., 2001). Roti ajus vastutab hipokampus ümbritseva keskkonna geomeetrilise informatsiooni kinnistamise eest (Lever jt., 2002; O'Keefe ja Burgess, 1996). Toitu varuvatel lindudel on hipokampus suhteliselt suurem (Barnea ja Nottebohm, 1994).

#### 1.4.4. Striatum ehk juttkeha

Funktsionaalsete eripärade alusel jaotatakse juttkeha dorsaalseks ja ventraalseks. Ventraalse juttkeha moodustavad haistekõbruke (*tuberculum olfactorium*) ja naalduv tuum (*nucleus accumbens*) ning dorsaalse juttkeha moodustavad sabatuum (*caudate nucleus*) ja kooriktuum (*putamen*). Juttkeha võtab närviimpulsse vastu ajukoorest, taalamusest, musttuumast (*substantia nigra*) ja keskaju dopamiinergilisest süsteemist. Juttkeha projitseerib punatuum (*nucleus ruber*) ja silda (*pons*). Juttkeha inhibitoorsed GABA-ergilised neuronid projitseerivad teise suuremasse basaaloosa üksusesse, kahvakehasse (*pallidum*) (Butler ja Hodos, 2005; Butler ja Cotterill, 2006). Juttkehas on valdavalt ogaliste jätketega neuronid. Nendega sünapseeruvad keskajust pärinevad mesolimbilise raja dopamiinergilised aksonid (Surmeier jt., 2007).

Linnu ajus on imetajate *caudate/putamen*i ehk dorsaalse juttkehaga homoloogilised piirkonnad lateraalne ja mediaalne *striatum*. Homoloogia aluseks on dopamiinergiliste aksoniterminalide olemasolu kahe liigi juttkehas (Balaban jt., 2010) ja atsetüülkoliinesteraasi ekspressioon (Karten, 1969). Dorsaalne ja ventraalne striatopallidaalne kompleks moodustuvad vastavalt dorsaalsest ja ventraalsest striatumist ja kahvakehast. Dorsaalne striatopallidaalne kompleks osaleb somaatilistes funktsioonides. Ventraalne striatopallidaalne kompleks osaleb limbiliste süsteemide toetamises (Butler ja Cotterill, 2006).

GABAergilised keskmisesuuruselised ogajätkelised neuronid võtavad vastu kortikaalsest osast ja taalamusest striatumisse saabunud informatsiooni. Nende neuronite vahendusel reguleerib dopamiin paljusid basaalganglioni psühhomotoorseid funktsioone, näiteks harjumuste kujunemine ja järjestikuste liigutuste kontrollimine. D1 perekonna retseptorid on nendes neuronites kõrgelt ekspresseeritud (Gerfen jt., 1992; Surmeier jt., 1996).

Linnu juttkehas asuvad laulutuumad, ka mittelaululindudel. Neid läbib laulu õppimise ja kuulamisega seotud närviimpulsi tsükel (Wild, 1993, 1994; Vates jt., 1996; Striedter ja Vu, 1998; Bottjer jt., 2000; Jarvis ja Mello, 2000; Jarvis jt., 2000, 2002; Lavenex, 2000). Striatumis asuvasse laulutuumas *higher vocal center*'sse (HVC) tulevad auditoorne ja muu sensoorne informatsioon läbi taalamuse ja *nidopallium*i. *Nidopallium* on mantliosa struktuur ja jaotub frontaalseks, vahelmiseks ja kaudaalseks (Reiner jt., 2004). Korduvatel innerveerimistel läbib impulss tsükli, millesse on kaasatud lisaks HVC'le ka teine juttkehas asuv laulutuum Area X, *nidopallium* ja taalamus. Tsüklis osalevad stimuleeriv glutamaatergiline ja inhibitoorne GABAergiline süsteem (Butler ja Cotterill, 2006).

#### 1.4.5. Amügdala ehk mandelkeha

Mandelkeha on mandlikujuline ajupiirkond, mis asub temporaalsagaras (Amaral jt., 1992). Imetajate ja lindude amügdalad on histokeemiliselt ja struktuurselt sarnased (Martínez-García jt., 2002). Imetaja ja linu mandelkeha jaotatakse palliaalseks ja subpalliaalseks ehk mantliosa päritolu ja basaalse päritolu tuumadeks. Palliaalse mandelkeha moodustavad väljaspool paiknev kortikaalne tuum, milles neuronid asetsevad laminaarselt ja seespool paiknev basolateraalne amügdala. Subpalliaalse mandelkeha moodustavad mediaalne ning tsentraalne tuum (Medina ja Reiner, 2000; Martínez-García jt., 2002; Smith-Fernández jt., 1998; Puelles jt., 2000; Abellán jt., 2006).

Mandelkeha osaleb seksuaalkäitumise kujunemises, haistmises, mälu funktsioonides ja

keskkonnast lähtuvate ohtude tuvastamises (Shumann, 2011). Basolateraalne amügdala osaleb kontekstipõhise hirmu tajumises (Sparta jt., 2014). Basolateraaelsesse amügdalasse tulevad sisendid taalamusest ja kortikaalsest osast. Hirmutunnetus tekib, kui basolateraalne mandelkeha innerveerib tsentraalset mandelkeha (Pitkänen jt., 1995). Tsentraalsesse ja basolateraaelsesse mandelkehasse tuleb emotsioonide ja maitsemeelega seotud informatsioon (Martínez-García jt., 2002).

Basolateraaelsesse mandelkehasse jäävad kolm tuuma: basolateraalne (BL), basomedialne (BM) ja lateraalne (LA) tuum. Need on osa emotsioonidega seonduvast süsteemist (Pitkänen jt., 1995).

Inimesel osaleb amügdala näoilmete ja hääletooni emotsionaalse tähenduse tajumises (Adolphs jt., 1995; Calder jt., 1996; Scott jt., 1997). Lastel ja noorukitel osaleb amügdala stiimulite tõlgendamisel, et veenduda kas stiimul on seotud mingi ohuga või mitte (Monk jt., 2003). Mandelkeha osaleb täiskasvanutel sotsiaalses tunnetuses, näiteks näoilmete emotsioonide tajumine, isiku usaldusväarsuse üle otsustamine, personaalse ruumi tajumine (Shumann, 2011). Pavlovi hirmu tingimine sõltub lateraalsete ja tsentraalsete amügdala tuumade vahelistest ühendustest (Campese jt., 2014).

## 2. Eksperimentaalne osa

### 2.1. Eksperimentaalse töö eesmärgid

- Kloneerida kana *Drd1a* cDNA fragment (riboproovi sünteesimiseks).
- Kirjeldada *Drd1a* ekspressioon täiskasvanud ja arenevas kodukana (*Gallus gallus domesticus*) otsajus *in situ* mRNA hübridisatsiooni meetodiga.
- Võrrelda *Drd1a* ekspressiooni *Wfs1* ekspressioonimustriga täiskasvanud ja arenevas kodukana otsajus.

### 2.2. Materjal ja metoodika

#### 2.2.1. Kana *Drd1a* cDNA fragmendi kloneerimine

##### ***Polümeraasi ahelreaktsioon***

PCR-ga (*Polymerase Chain Reaction*) paljundati kana *Drd1a* cDNA, kasutades praimereid:

*Forward* praimer (For1) – 5' - ATG ACT TGG AAC GAC ACC ACT - 3'

*Reverse* praimer (Rev1) – 3' – GGT CGT TGG ACT CTC GTT GA - 5'

PCR'i segu koosnes järgmistest komponentidest: 1x B-puhver (Fermentas), 3 mM MgCl<sub>2</sub> (Fermentas), 0,4 mM dNTP, 0,7 µM praimereid (For1 ja Rev1), 2,5 U Taq polümeraas, 16,8 µg cDNA.

Kogumahuks oli 50 µl. PCR teostati termotsükleris järgnevatel tingimustel:

95°C – 5 minutit

95°C – 30 sekundit

58°C – 40 sekundit

72°C – 1 minut

72°C – 10 minutit

} 33 tsüklit

PCR produkte analüüsiti 1% TAE (Tris-atsetaat-EDTA) agarosgeel-elektroforeesil TAE puhvris. Saadud produkti pikkuse määramiseks kasutati DNA pikkusmarkerina 1kb DNA *ladder*-it (Fermentas).

PCR-i produkt puhastati QIAquick PCR Purification Kit'i (Qiagen) kolonni abil firma protokolliga kasutades.

##### ***cDNA ja plasmidi restriksioon***

Kana cDNA fragmendi sisestamiseks pBluescript KS+ plasmidi restrikteeriti PCR-i produkti NotI ja SalI restriктаasidega (praimeritele olid vastavate restriктаaside äratundmiskohad

disainitud). Restriksioonisegu koosnes järgmistest komponentidest: 8U NotI (Fermentas), 8U SalI (Fermentas), 1x Orange puhver (Fermentas) ja 1µg DNA. Kogumahuks oli 65 µl. pBluescript KS+ plasmidi lõigati samade restriктаasidega 150 µl-s, segu koostis: 1x Orange puhver (Fermentas), 20U SalI, 20U NotI, 6 µg pBluescript KS+. Vabade 5' fosfaatrühmade eemaldamiseks töödeldi lõigatud plasmidi aluselise fosfataasiga (CIAP ehk *calf intestine alkaline phosphatase*). Restriksioonid toimusid kaks tundi 37°C juures. Peale restriksiooni kanti segud geelile ja puhastati õige pikkusega fraktsioonid QIAquick Gel Extraction Kit'i (Qiagen) kolonniga.

### **Ligeerimine**

Kana *Drd1a* cDNA ligeeriti pBluescript KS+ plasmidi. Ligeerimisegu koosnes järgmistest komponentidest: 250 ng SalI ja NotI-ga lõigatud kana *Drd1a* cDNA'd, 200 ng SalI ja NotI-ga lõigatud pBluescript KS+ plasmidi, 1x ligaasipuhver (Fermentas), 5 U T4 DNA ligaasi (Fermentas).

Kogumahuks oli 20 µl. Ligeerimisel kasutati termotsüklerit järgmistel tingimustel:

16°C 10 minutit	} 7 tsükli
18°C 10 minutit	
20°C 10 minutit	

Ligeerimise inaktiveerimiseks inkubeeriti segu 65°C juures 15 minutit. Joonisel 4 on näidatud kana *Drd1a* cDNA fragmendi paiknemine pBluescript KS+ plasmidis.

### **Transformatsioon**

Kana *Drd1a* fragmendiga plasmiid sisestati *Escherichia coli* DH5α tüve CaCl<sub>2</sub>-ga töödeldud bakterirakkudesse. 50 µl bakterirakke segati 10 µl ligeerimisseguga ja hoiti jääl 30 minutit. Seejärel inkubeeriti segu 37°C juures 3 minutit ja jahutati jääl 2 minutit. Segule lisati 1 ml Lurea Bertani (LB) söödet ja inkubeeriti 37°C juures 1,5 tundi. Kasvanud rakud tsentrifuugiti 3420 g juures 3 minuti jooksul tuubi põhja. Liigne supernatant eemaldati, seejuures 100 µl jäeti alles plaatimise tarbeks. Rakud plaaditi ampitsilliini sisaldava selektiivsöötmega Petri tassidele. Nendele oli eelnevalt kantud segu, mis koosnes 0,5 µg X-Gal-st (5-bromo-4-kloro-3-indolüül-beta-D-galaktopüranosiid), 8,7 mM IPTG'st (isopropüül-beta-D-tiogalaktopüranosiid) ja 100 µl vedelast LB'st. Petri tasse inkubeeriti 37°C termokapis 24 tundi. Valgetele kolooniatele tehti valikuliselt PCR. PCR produkte analüüsiti 1% TAE (Tris-atsetaat-EDTA) agarosgeel-elektroforeesil TAE puhvris. Valge bakterikoloonia, milles oli

*Drd1a* fragment, külvati 2 ml LB söötmesse, millesse oli eelnevalt lisatud 200 µg ampitsilliini, ja kasvatati 24 tundi 37°C juures.

### ***Plasmiidi eraldamine bakterist***

Plasmiid eraldati *E. coli* DH5α bakterist Invitex Plasmid Mini Two Kit'iga tootja protokoll järgides.

### ***Sekveneerimine***

Plasmiidi ligeerunud *Drd1a* fragment lasti sekveneerida Eesti Biokeskuses ABI 3130xl Genetic Analyzer abil seadmele määratud protokoll alusel.

#### **2.2.2. Kana *Drd1a* RNA proovi süntees ja eelnevad etapid**

### ***Plasmiidi lineariseerimine***

Et sünteesida *antisense* proov, lineariseeriti kana *Drd1a* cDNA fragmenti sisaldav plasmiid SalI-ga. Lineariseerimisegu (100µl) koostis oli järgnev: 2 µg plasmiidset DNA'd, 1x O+ puhver (Fermentas), 30 U restriktas SalI (Fermentas). *Sense* proovi sünteesimiseks kasutatud lineariseerimisegu (80µl): 2 µg plasmiidset DNA'd, 1x O+ puhver (Fermentas), 25 U restriktas NotI (Fermentas). Kogumahuks oli 80 µl. Plasmiidi lõigati poolteise tunni jooksul 37°C juures.

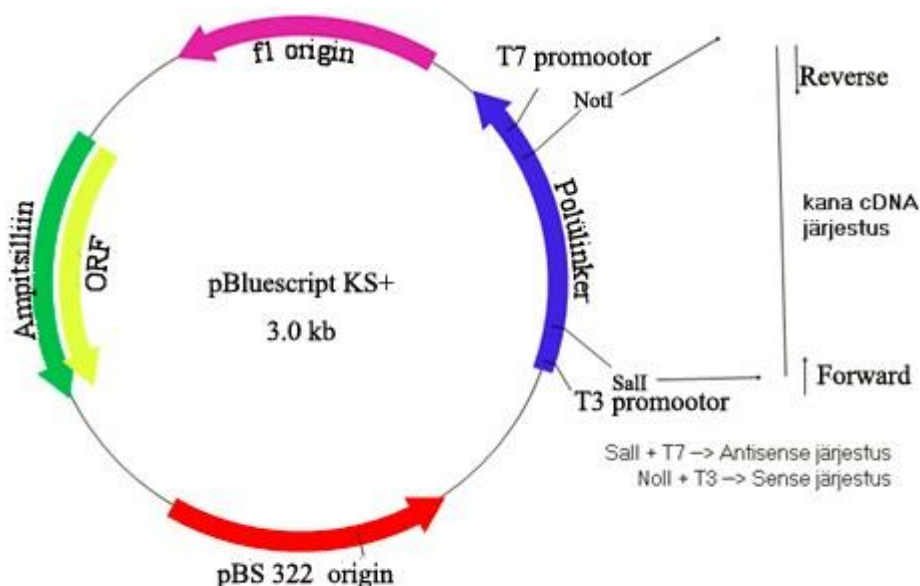
### ***Plasmiidi puhastamine***

Restriksioonisegu töödeldi fenooliga, et vabaneda RNAasi saastest. Lahusesse lisati MQ-d kogumahu 250µl ja 250 µl fenooli. Segu segati *vortex*'il ja tsentrifuugiti maksimaalsel kiirusel (16 060 g) 5 minutit. Pealmine vesikiht eraldati. Fenoolijääkidest vabanemiseks lisati vesikihile 250 µl kloroformi, segati *vortex*'il ja tsentrifuugiti maksimumkiirusel 3 minutit. Pealmine vesikiht eraldati. Vesikihis olev plasmiid sadestati 24 tundi -20°C juures kasutades 1/10 mahtu 5M NaCl ja külma 96 protsendilist etanooli.

### ***RNA proovi süntees***

Lineariseeritud plasmiididelt sünteesiti RNA proovid. Transkriptsioonisegu koosnes: 1x transkriptsioonipuhver (Fermentas), 1x Dig-märgistatud NTP (Roche), 1 µg lineariseeritud plasmiidi, 20U ribonukleaasi inhibiitorit (Promega), *antisense* proovi jaoks 20U T7 RNA polümeraasi (Fermentas) ja *sense* proovi jaoks 20U T3 RNA polümeraasi (Fermentas). Kogumahuks oli 20 µl. Segu inkubeeriti 2,5 tundi 37°C juures, kontrolliti transkriptsiooni

kulgu 1% agarosi/1x TAE geelelektroforeesil ja lõpuks lisati segule 15 minutiks 1 µl RNAasi vaba DNAas I'te (Fermentas) DNA lagundamiseks. RNA sadestamiseks lisati transkriptsioonisegule 100 µl MQ-d, 10 µl 4M LiCl ja 300 µl külma 96% etanooli ning segu hoiti üleöö -20°C juures. Proovide ülesvõtmiseks tsentrifuugiti RNA põhja, pesti sadet 70% etanooliga ja lahustati 50% formamiidis. RNA proovide kontsentratsioon mõõdeti NanoDrop 8000'ga.



**Joonis 2** pBluescript KS+ plasmiid kana cDNA järjestusega. Kana cDNA on ligeeritud plasmidi polülinkerisse NotI ja SalI restriктаaside abil.

### 2.2.3. Kana aju materjali töötlemine

Täiskasvanud, P0, E15 ja E13 vanuses kanade ajud pesti pärast dissekteerimist PBS's ning fikseeriti 4°C juures 4% PFA-ga PBS's (paraformaldehüüd fosfaatpuhverdatud soolalahuses). Nelja ööpäeva möödudes krüoprotekteeriti E13, E15 ja P0 vanuste kanade ajud ning viie ööpäeva möödudes krüoprotekteeriti täiskasvanud kana aju 4% PFA/20% sahharoosi lahusega PBS-s 4°C juures üleöö, misjärel külmutati -80°C juures. Ajud lõigati krüomikrotoomi (Microm HM-560) kasutades -20°C juures 40 µm lõikudeks. Ajulõigud, mida ei hübridiseeritud samal päeval, jäeti prehübridisatsioonilahusesse (50% formamiid ja 5x SSC, pH5) -20°C juurde. Pärast lõikamist permeabiliseeriti rakumembraanid 0,25% TritonX PBS's, millele järgnes soolade kontsentratsiooni tasakaalustamiseks pesu 5 minutit 5x SSC'ga (pH 5).

#### 2.2.4. *In situ* hübridisatsioon Dig-märgistatud riboprooviga vabalt ujuvatele kana aju lõikudele

Prehübridisatsioon: lõikudele lisati prehübridisatsioonisegu (50% formamiid, 5x SSC pH5, 2% BR (Blocking Reagent; Roche) ning inkubeeriti 65°C juures loksumas 1,5 tundi.

Hübridisatsioon: RNA proovi denatureerimiseks kuumutati seda 5 minutit 80°C juures. Proov asetati jääle kohe pärast kuumutamist. Proov segati prehübridisatsioonilahusega (1µg/ml) ja lisati ajalõikudele. Lõike inkubeeriti üleöö loksudes 65°C juures.

Hübridisatsioonijärgsed pesud: järgmisel päeval pesti ajalõike hübridisatsioonilahuse eemaldamiseks 50% formamiidi, 5X SSC pH5 ja 1% SDS'i sisaldavas lahuses 30 minutit 65°C juures loksudes. Seejärel pesti 2X 30 minuti jooksul 60°C juures loksudes lahusega, mis sisaldas 50% formamiidi ja 2X SSC pH5. Järgnevalt pesti ajalõike 3X5 minuti jooksul toatemperatuuril TBST-ga (25 mM Tris-HCl pH 7,5; 140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 0,1% Tween20).

Immunohistokeemia: Ebaspetsiifilise seondumise blokeerimiseks inkubeeriti lõike toatemperatuuril loksumas 1,5h 2% BR-ga TBST lahuses. Seejärel inkubeeriti lõike üleöö 4°C juures loksutil aluselise fosfataasiga (AP) konjugeeritud digoksügeniini vastase antikeha (Anti-Dig Fab Fragments, Roche) (1:2000, lahustatuna 1% BR/TBST lahuses) juuresolekul. Järgmisel päeval pesti lõike toatemperatuuril 3X5 minutit TBST-s ja 2X10 minutit NTMT-s (100 mM Tris-HCl pH 9,5; 100 mM NaCl; 50 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,1% Tween20). Värvusreaktsiooni esilekutsumiseks lisati aluselise fosfataasi substraati (BM purple AP substrate, Roche) Lõikudel lasti värvuda 20 tundi ja värvusreaktsioon peatati lõikude PBS-i tõstmisega.

#### 2.2.5. Mikroskoopia ja pilditöötlus

Lõigud tõsteti 0,5% želatiini lahusesse ja sealt alusklaasile. Lõikudel lasti kuivada ja sulundati Pertexiga (Serva). Lõike pildistati Olympus DP71 kaameraga varustatud Olympus BX51 mikroskoobiga. Piltide seadmiseks kasutati Adobe Photoshop'i arvutiprogrammi.

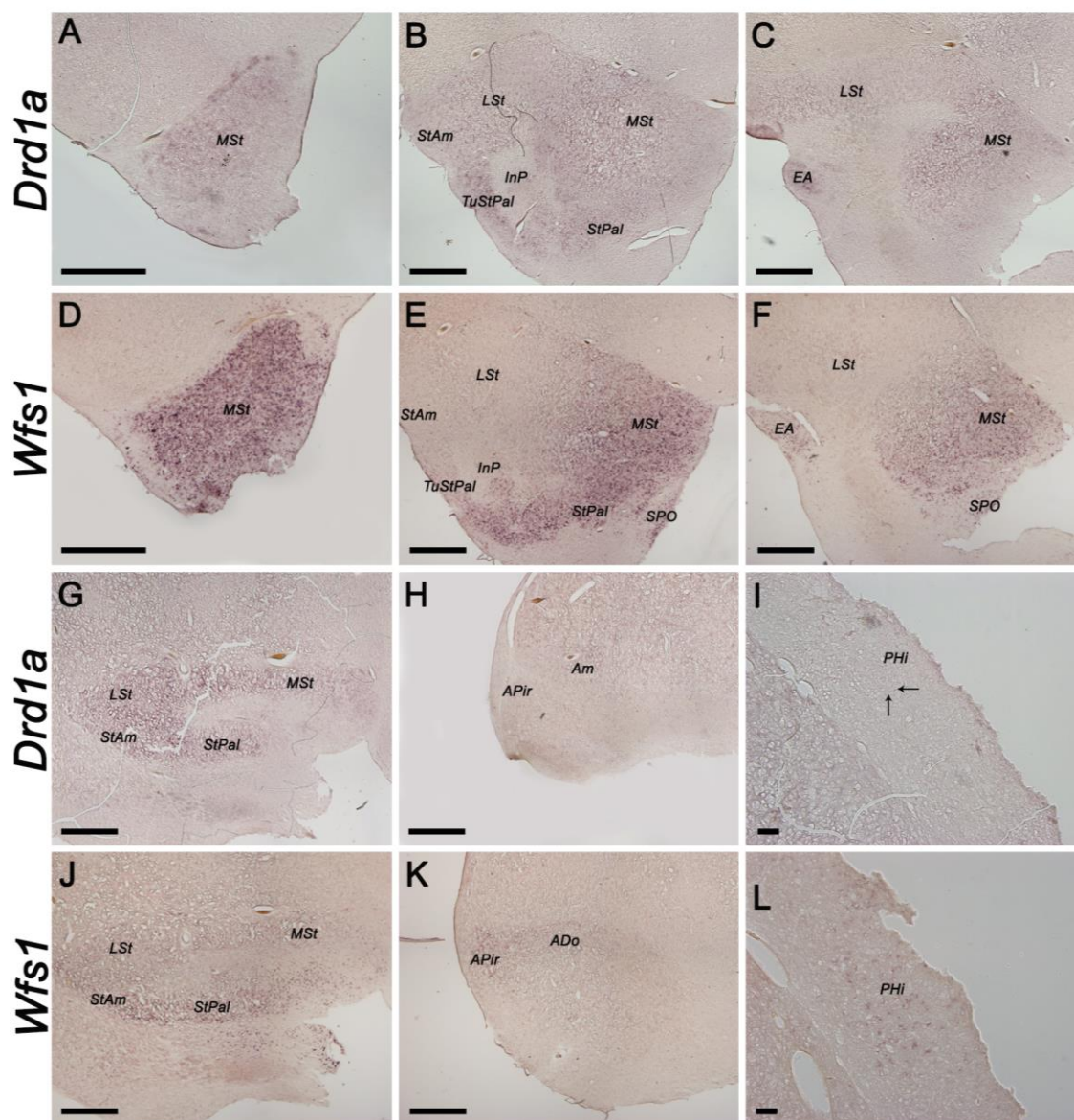


## 2.3. Tulemused

### 2.3.1 *Drd1a* ekspressioon kana (*Gallus gallus domesticus*) otsajus

#### Täiskasvanud kana

Täiskasvanud linnu tugevaim *Wfs1* ja *Drd1a* ekspressioon on mediaalses juttkehas, striopallidaalses piirkonnas ja haisteköbrateses (Joonis 3). Rostraalses mediaalses *striatum*'is avaldub *Drd1a* nõrgemini kui *Wfs1*, posterioorses osas on *Drd1a* ekspressioonisignaal sarnane *Wfs1* omaga.



**Joonis 3.** *Drd1a* ja *Wfs1* ekspressioon täiskasvanud kana otsaju koronaallõikudel. mRNA *in situ* hübridisatsioon. **A-C, G - I:** *Drd1a* ekspressioon; **D - F, J-L:** *Wfs1* ekspressioon. Lõigud A-C, G, H ning D-F, J, K on rostrokaudaalses järjestuses. ADo - dorsaalne amügdala, Am - amügdala, APir – amügdala-piriform cortex'i üleminekuala, EA - laiendatud amügdala,

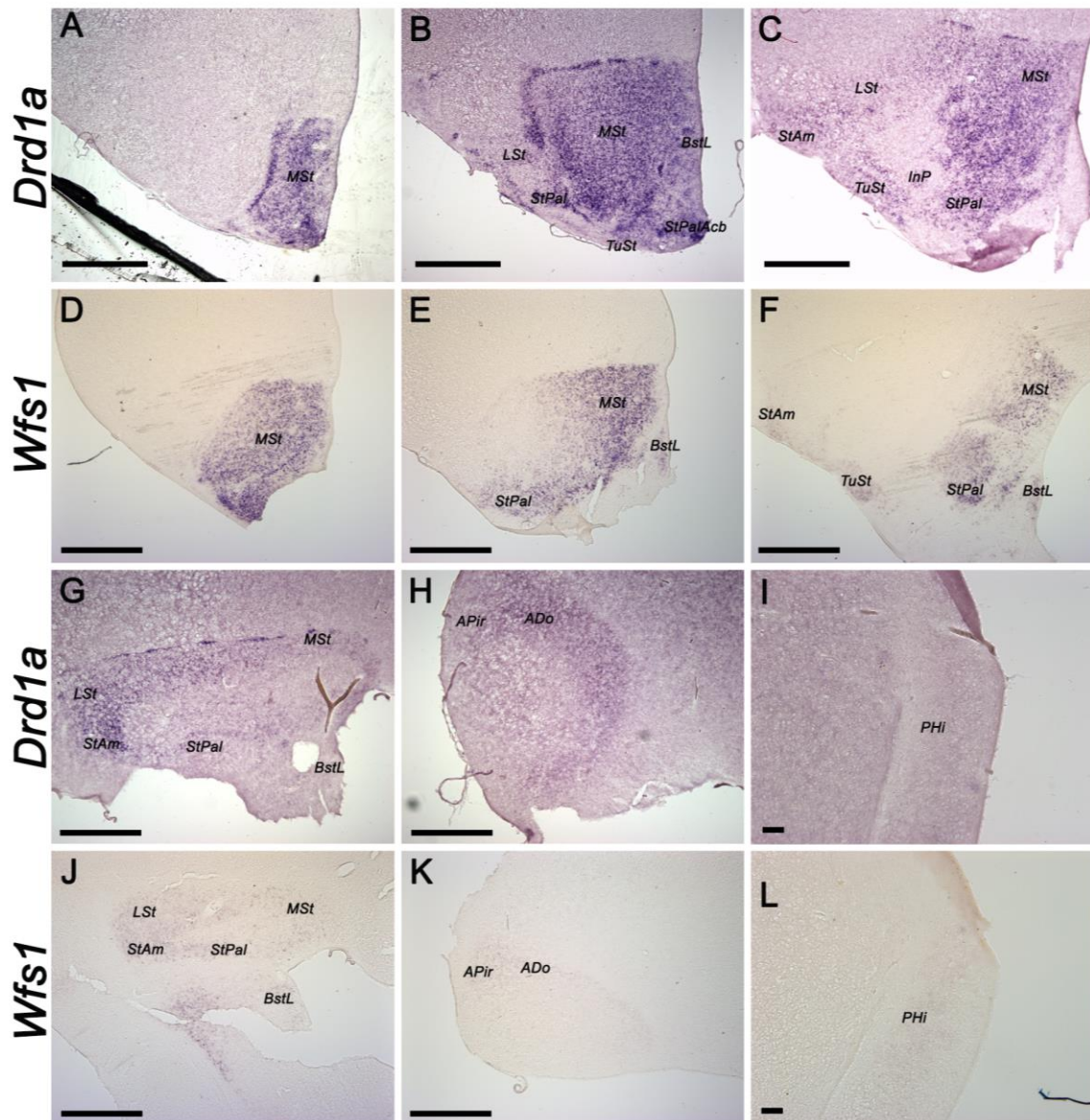
InP - *interpenduncular nucleus*, LSt - lateraalne *striatum*, MSt - mediaalne *striatum*, PHi - parahipokampus, SPO –*striopallidal organ*, StAm - *striatum*'i-amügdala üleminekuala, StPal - *striatum*'i-pallidum'i üleminekuala, TuStPal-haisteköbrukesestriopallidaalne piirkond. Lõikudel A-C, D-F, G, H, J, K näitab skaala 1 mm, lõikudel I ja L näitab skaala 100 µm.

Lateraalses *striatum*'is on *Wfs1* ekspressioonisignaal rostraalses ja mediaalses osas vaevumärgatav ja tugevneb posterioorses osas. *Drd1a* ekspressioon on vastavas piirkonnas keskmise tugevusega läbivalt rostraalsel-kaudaalsel suunal (Joonis 3B,C,E,F,G,J). Striopallidaalses piirkonnas on *Wfs1* signaal posterioorses osas nõrgem kui rostraalses osas, *Drd1a* näitab ühtlasema tugevusega ekspressiooni (Joonis 3B, E, G, J). Haisteköbrukeses on *Drd1a* ekspressioon rostraalses otsajus tugevam kui *Wfs1* (Joonis 3B,E). *Striatum*'i-amügdala üleminekuala ei näita olulist erinevust *Drd1a* ja *Wfs1* ekspressioonitugevuste vahel, rostraalses osas on signaal nõrk ja posterioorses osas keskmise tugevusega (Joonis 3B,E,G,J). *Interpenduncular nucleus*'es avalduvad rostraalses otajus *Wfs1* ja *Drd1a* nõrgalt (Joonis 3B,E). Striopallidaalses organis esineb tugev *Wfs1* signaal rostraalses otsajus ja keskmise tugevusega signaal mediaalses osas. *Drd1a* ekspressioon vastavas piirkonnas puudub (Joonis 3B,C,E,F). Laiendatud mandelkehas esineb mõlemal geenil keskmise tugevusega ekspressioon otsaju mediaalses osas (Joonis 3C,F). Dorsaalses amügdala's, amügdala-piriform cortex'i üleminekualas ja parahippokampuses on *Wfs1* ekspressioon keskmise tugevusega ja *Drd1a* avaldub oluliselt nõrgemini (Joonis 3H,I,K,L). *Nidopallium*'i kaudaalses osas esineb nõrk *Drd1a* ekspressioon lateraalses ja *island field*'i piirkonnas. Nimetatud piirkondades *Wfs1* ei avaldu.

## Vanus P0

P0 vanuse linnu tugevaim *Wfs1* ja *Drd1a* ekspressioon esineb mediaalses juttkehas ja *lateral bed nucleus of stria terminalis*'es (Joonis 3). Mediaalses *striatum*is on rostraalselt tugev ekspressioon ja nõrgeneb kaudaalses suunas. *lateral bed nucleus of stria terminalis*'es on rostraalses otsajus keskmise tugevusega ekspressioon, mis nõrgeneb kaudaalses suunas (Joonis 4A-G,J). *Wfs1* ekspresseerub lateraalses juttkehas kaudaalses osas nõrgalt. *Drd1a* avaldub mainitud piirkonnas keskmise tugevusega rostraalses osas ja tugevneb vähesel määral kaudaalses suunas (Joonis 4B,C,E,F,G,J). *Striatum*'i-amügdala üleminekualas avalduvad mõlemad geenid keskmise tugevusega, *Drd1a* signaal tugevneb kaudaalselt, *Wfs1* avaldub ühtlasemalt (Joonis 4C,F,G,J). Haisteköbrukeses avaldub *Drd1a* tugevalt rostraalses otsajus ja nõrgeneb kaudaalses suunas. Mediaalses tasandis on *Wfs1* signaal keskmise tugevusega (Joonis 4B,C,F). Striopallidaalses piirkonnas on rostraalses tasandis *Wfs1* ekspressioon

keskmise tugevusega ja *Drd1a* ekspressioon tugev, kaudaalses suunas ekspressioonisignaali nõrgenevad (Joonis 4B,C,E,F,G,J). Dorsaalne mandelkeha ja *amügdala-piriform cortex*'i üleminekuala näitavad nõrka *Wfs1* ja keskmist *Drd1a* ekspressioonisignaali (Joonis 4H,K). *Interpenduncular nucleus*'es esineb nõrk *Drd1a* ekspressioon (Joonis 3C). *Striopallidal area of the accumbens nucleus*'es avaldub *Drd1a* tugevalt (Joonis 4 B).



**Joonis 4. *Drd1a* ja *Wfs1* ekspressioon vastkoorunud (P0) kana otsaju koronaallõikudel. mRNA *in situ* hübridisatsioon. A-C, G - I: *Drd1a* ekspressioon; D - F, J-L: *Wfs1* ekspressioon. Lõigud A-C, G, H ning D-F, J, K on rostrokaudaalses järjestuses. ADo - dorsaalne amügdala, APir - amügdala-piriform cortex'i üleminekuala, BstL - bed nucleus of stria terminalis, lateral part, EA - laiendatud amügdala, InP - interpenduncular nucleus, LSt - lateraalne striatum, MSt - mediaalne striatum, PHi - parahippokampus, StAm - striatum'i-amügdala üleminekuala, StPal - striatum'i-pallidum'i üleminekuala, TuSt-haisteköbrukesestriataalne piirkond. Lõikudel A-C, D-F, G, H, J, K näitab skaala 1 mm, lõikudel I ja L näitab skaala 100 µm.**

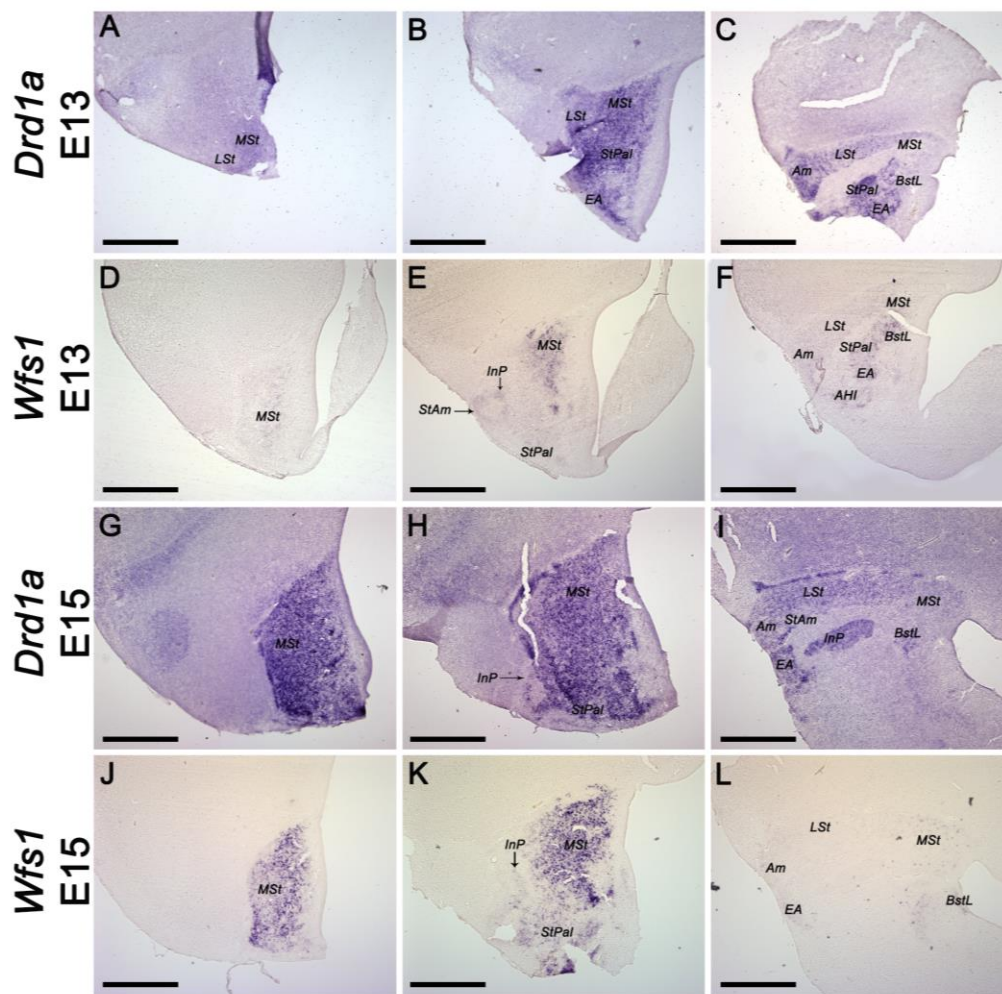
Parahippokampuses on ekspressioonisignaali nõrgad (Joonis 4I,L). *Nidopallium*'i kaudaalse



osa *island field*'is ja lateraalses piirkonnas on tugev *Drd1a* ekspressioon. Keskmise tugevusega *Drd1a* ekspressiooni leidub *lateral septal nucleus*'es, *nidopallium*'i kaudolateraalises piirkonnas ja kaudodorsolateraalises *pallium*'is. Nõrka *Drd1a* ekspressiooni esineb *mesopallium*'i dorsaalses ja ventraalses osas, *nidopallium*'i intermediaalses ja frontaalses osas ning auditoorses alas ja *hyperpallium*'is.

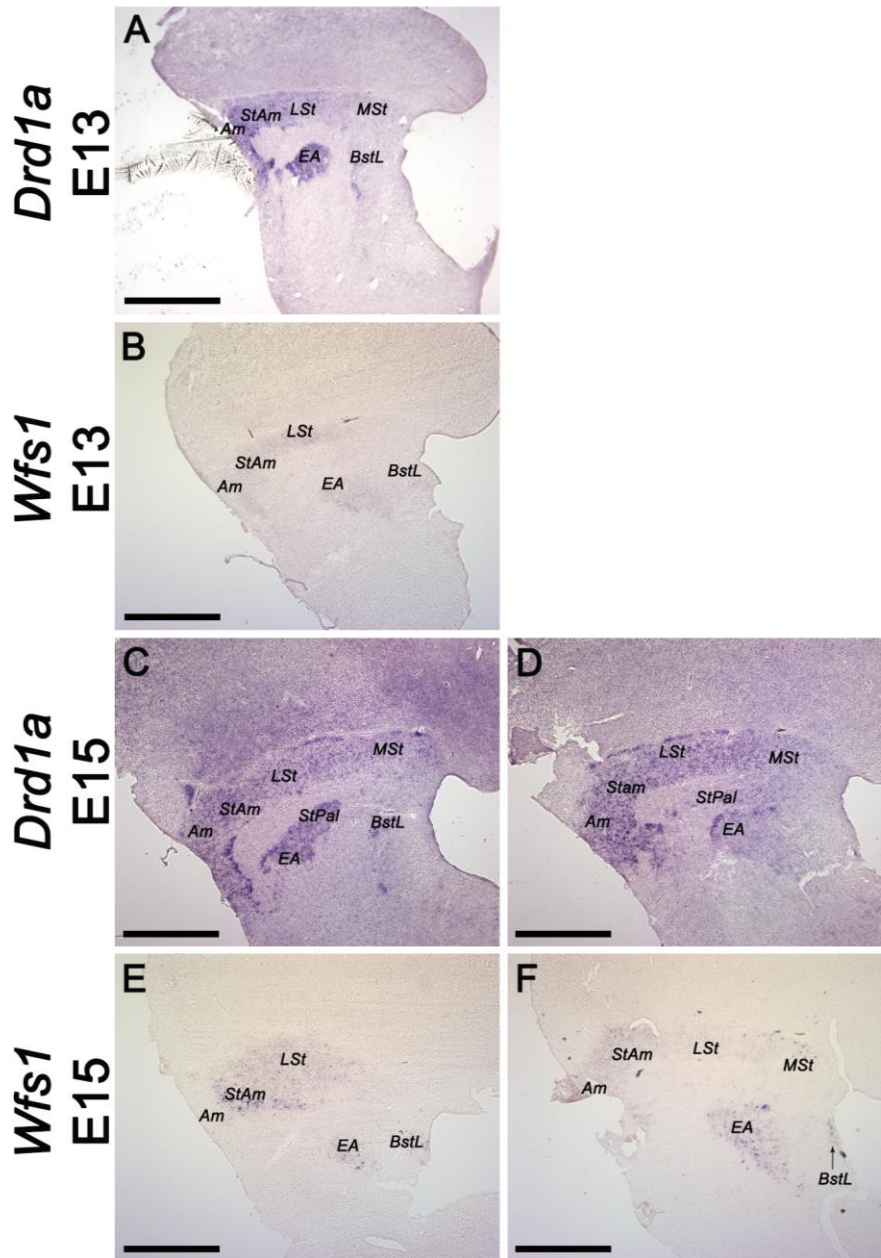
### Vanus E13 ja E15

E13 ja E15 vanuste lindude tugevaim *Drd1a* ja *Wfs1* ekspressioon on mediaalses juttkehas ja striopallidaalses piirkonnas. Mediaalses juttkehas tugevnevad mõlema geeni ekspressioonisignaalid mediaalse tasandini ja nõrgenevad kaudaalses suunas.



**Joonis 5.** *Drd1a* ja *Wfs1* ekspressioon E13 ja E15 vanuste kanade otsaju rostraalsetel koronaallõikudel. mRNA *in situ* hübridisatsioon. **A-C:** *Drd1a* ekspressioon vanuses E13; **D-F:** *Wfs1* ekspressioon vanuses E13. **G - I:** *Drd1a* ekspressioon vanuses E15; **J-L:** *Wfs1* ekspressioon vanuses E15. Lõigud A-C, G-I ning D-F, J-L on rostrokaudaalses järjestuses. Am - amügdala, BstL - *bed nucleus of stria terminalis, lateral part*, EA - laiendatud amügdala, InP - *interpenduncular nucleus*, LSt - lateraalne *striatum*, MSt - mediaalne *striatum*, StAm - *striatum*'i-amügdala üleminekuala, StPal - *striatum*'i-pallidum'i üleminekuala. Skaala 1 mm.

*Drd1a* avaldub vastavas piirkonnas mõnevõrra tugevamalt kui *Wfs1* (Joonis 4; Joonis 5). Striopallidaalses piirkonnas esineb *Drd1a* tugevat ekspressiooni rostraalses ja mediaalses tasandis. Vastavas piirkonnas avaldub *Wfs1* oluliselt nõrgemini, näidates tugevaimat signaali E15 vanuses rostraalses tasandis (Joonis 4B,C,E,F,H,K; Joonis 5C,D). Lateraalses juttkehas avaldub *Wfs1* enamjaolt nõrgalt, tugevnedes mõnevõrra kaudaalses suunas.



**Joonis 5. *Drd1a* ja *Wfs1* ekspressioon E13 ja E15 vanuste kanade otsaju kaudaalsetel koronaallõikudel. mRNA *in situ* hübridisatsioon. A:** *Drd1a* ekspressioon vanuses E13; **B:** *Wfs1* ekspressioon vanuses E13. **C, D:** *Drd1a* ekspressioon vanuses E15; **E, F:** *Wfs1* ekspressioon vanuses E15. Lõigud C-D ning D-F, J-L on rostrokaudaalses järjestuses. Am - amügdala, BstL - *bed nucleus of stria terminalis, lateral part*, EA - laiendatud amügdala, LSt - lateraalne *striatum*, MSt - mediaalne *striatum*, StAm - *striatum*'i-amügdala üleminekuala, StPal - *striatum*'i-pallidum'i üleminekuala. Skaala 1 mm.

*Drd1a* ekspressioon jääb E15 vanusel linnul rostraal-kaudaalses suunas ühtlaselt tugevaks, E13 vanuses nõrgeneb kaudaalses suunas (Joonis 5A-C,F,I; Joonis 6). Laiendatud mandelkehas avaldub *Drd1a* rostraal-kaudaalses suunas ühtlase tugevusega. *Wfs1* ekspressioon on laiendatud amügdalas üldjuhul nõrk, andes tugevaima signaali E15 vanusel linnul kaudaalses osas (Joonis 5C,F,I,L; Joonis 6). Amügdaloidkompleksis ekspresseerub *Wfs1* nõrgalt ja *Drd1a* tugevalt (Joonis 5C,F,I,L; Joonis 6). *lateral bed nucleus of stria terminalis*'es on enamjaolt ekspressioon nõrk, *Drd1a* avaldub tugevalt E15 vanusel linnul (Joonis 5C,F,I,L; Joonis 6A-C,E,F). *Striatum*'i-amügdala üleminekuosas esineb ekspressiooni vähesel määral varieerudes nõrgast tugevani (Joonis 5E,I; Joonis 6D,E). *Interpeduncular nucleus*'es on nõrk ekspressioon (Joonis 5E,H,I,K). Amügdalohippokampaalses piirkonnas esineb tugevat *Drd1a* ja nõrka *Wfs1* ekspressiooni (Joonis 6C,D,F). *Visual nidopallial nucleus*'es, *nidopallial island field*'is, *nidopallium*'i kaudolateraalses piirkonnas ja *mesopallium*'i ventraalses osas on keskmise tugevusega *Drd1a* ekspressioon.

#### 2.4. Arutlus

Käesolevas uurimustöös uuritud *Drd1a* ekspressioonimuster langes suurel määral kokku *Wfs1* ekspressiooniga. Mõlemad geenid ekspresseerusid tugevalt põhiliselt otsaju basaalse struktuurides. Mõlema geeni puhul paiknes tugevaim ekspressioon kõikides vanustes *MSt*-s, kuid *Wfs1* ekspressioonipiirkond ei ulatunud seal lateraalselt nii kaugemale kui *Drd1a*-l. Kummagi geeni ekspressiooni ei leidunud *globus pallidus*'es, kuid seda ümbritsevates piirkondades ekspresseerusid mõlemad geenid sarnaselt. *Wfs1* puhul on see muster analoogne hiire ajuga, kus ekspressioon samuti *globus pallidus*'est puudub, ent esineb seda ümbritsevates piirkondades (ventraalses ja dorsaalses juttkehas, amügdalas, *BStL*-s; Luuk jt, 2008; Tekko jt, 2014). Mainitud *Wfs1* ekspresseerivatesse piirkondadesse jõuavad imetajal keskajust dopamiinergilised aksonid (Van den Heuvel ja Pasterkamp, 2008). Eeltoodud info toetab oletust, et dopamiini signalisatsioon ja *Wfs1* võivad omada funktsionaalset seost.

Roti ajus on tugev D1 retseptori ekspressioon juttkehas, haisteköbrikeses, *nucleus accumbens*'is, mustolluses, *nucleus interstitialis striae terminalis*'es, olfaktoorses koores, *entopeduncular nucleus*'es, *subthalamic nucleus*'es, *claustrum*'is ja amügdala-hipokampuse ülemineku alas. Nõrgemat ekspressiooni on nähtud suuraju koores, basolateraalses, mediaalses ja lateraalses amügdala tuumas, *endopiriform nucleus*'es, *globus pallidus*'es ja keskaju ülakünnas (Savasta jt., 1986). Keskmise ekspressioon on veel *septum*'is, *habenula*'s, hüpotaalamuses, ventraalses tegmentaalses piirkonnas ja hipokampuses (Dubois jt., 2003). Mitmete mainitud piirkondade homoloogides esineb *Drd1a* ekspressioon kodukana ajus.

Sun ja Reiner (2000) näitasid P0 vanustes kodukanades sarnaselt käesoleva uurimistööga tugevat *Drd1a* ekspressiooni *MSt*-s ja haisteköbrukeses. Rostraalses ostajus olev tugev ekspressioon *nucleus accumbens*'is on näidatud mõlemas uurimistöös. Huvitaval kombel ei leidunud seal *Wfs1* ekspressiooni, kuigi imetajas ekspresseerib *nucleus accumbens* väga tugevalt *Wfs1*-e (Luuk jt., 2008; Tekko jt., 2014). *InP*-s ja *LSt*-s näitasid Sun ja Reiner hinnanguliselt tugevamat ekspressiooni, võrreldes antud uurimistööga. Uurimistulemused kattuvad dorsaalses amügdalas ja kaudolateraalses *nidopallium*'is näidatud keskmise ekspressioonitugevuse osas. Tulemused erinevad *visual core nucleus*'es näidatud ekspressiooni osas, kus Sun ja Reiner leidsid olevat nõrga *Drd1a* ekspressiooni signaali. Antud uurimistöös näidatud *Drd1a* ekspressiooni P0 vanuste kanade *BStL*-s ja *StPal*-s Sun ja Reiner ei tuvastanud. *StAm*-s nägid Sun ja Reiner tugevamat ekspressioonisignaali kui antud uurimistöös. (Sun ja Reiner, 2000).

Käesolevas uurimistöös näidatud *Drd1a* ja *Wfs1* ekspressioonide kattuvus viitab võimalikule funktsionaalsele seosele dopamiini retseptori tüüp D1A ja *Wfs1* vahel. Pankrease  $\beta$ -rakkudes on näidatud, et *Wfs1* tekitab glükoosiga stimuleerimise korral plasmamembraanis adenülaadi tsüklaas 8-ga (AC8) kaltsium-kalmoduliin sõltuva kompleksi. Selles kompleksis toodetakse cAMP-d, mille taseme tõus on vajalik insuliini tootmiseks ja vabastamiseks (Fonseca jt., 2012). AC8 ekspresseerub ka neuronites ning on seal seotud dopamiini retseptoriga (Missale jt., 1998). Toetudes eeltoodud faktidele, võib oletada, et ka neuronites võib tekkida kompleks AC8 ja *Wfs1* vahel. *Drd1a* ja *Wfs1* ekspressioonide suur kattuvus arenevas ja täiskasvanud kodukana ajus toetab seda hüpoteesi.

Järgnevalt tuleks vaadata AC8 ekspressiooni kodukana ajus. Imetaja ajus on tugevaim AC8 ekspressioon leitud haisteköbrukeses, taalamuses, *habenula*'s, suuraju koores, hüpotaalamuse supraoptilistes ja paraventriculaarsetes tuumades (Muglia jt., 1999). Hiires on AC8 ekspressioon ajutüves, vaheaigus ja otsajus. Tugevat ekspressiooni on suurajukoore IV ja V kihis, haisteköbrukeses, *habenula*'s, hüpotaalamuse supraoptilistes tuumades, *superior colliculus*'es, sillatuumades ja oliivides (Nicol jt., 2005). AC8 ekspresseerumine mainitud piirkondades pigem ei toeta oletust, et selle ekspressioon kattub *Wfs1* ja *Drd1a* ekspressiooniga, kuid kana AC8 spetsiifilise RNA proovi kasutamine annaks selgitust.

## KOKKUVÕTE

*Drd1a* kodeerib valku D1A, mis on enim ekspresseeritud dopamiini retseptor kõigis selgroogsetes (Yamamoto jt., 2012). Hiired, kes on puudulikud D1 retseptori suhtes, on hüperaktiivsed (Missale jt., 1998). Dopaminergiline süsteem osaleb mootorikas, motivatsioonis ja mälu kujundamisel (Wise, 2004). Eristatakse kolme erinevat dopamiinergilist juhteteed: nigrostriataalne, mesokortikaalne ja tuberoinfundibulaarne (Alttoa jt., 2009; Di Chiara ja Imperato, 1988; Lechan jt., 1980). Paljudes piirkondades, kuhu saavad dopamiinergilised juhteteed, ekspresseerub *Wfs1* geen (Luuk jt., 2008). *Wfs1* geeni produkt osaleb ER stressi vastuse, raku kaltsiumi homöostaasi ning pankrease  $\beta$ -rakkudes insuliini sekretsiooni regulatsioonis (Takei jt., 2006; Fonseca jt., 2010; Fonseca jt., 2012). Pole teada, kas *Wfs1* osaleb sünaptilistes protsessides.

Eksperimentaalselt kloneeriti kana *Drd1a* cDNA fragment ning sellelt sünteesitud riboprooviga kaardistati *in situ* hübriidisatsiooniga *Drd1a* ekspressioon täiskasvanud ja arenevas kodukana (*Gallus gallus domesticus*) ajus. *Drd1a* ekspressiooni võrreldi *Wfs1* ekspressiooniga kodukana ajus. Täpsemad tulemused ja tehtud järeldused käesolevast tööst:

- *Drd1a* ekspresseerub tugevamalt arenevas kodukana ajus (E13, E15, P0), täiskasvanus on ekspressioon nõrgem. Tugevaim *Drd1a* ekspressioon on mediaalses juttkehas, striopallidaalses piirkonnas ja haisteköbrukeses. Mediaalses striatumis ja striopallidaalses piirkonnas on *Drd1a* mRNA'd kõige enam varasemas arengus ja täiskasvanueas. BstL's, *nidopallium*'i kaudaalse osa *island field*'is ja lateraalses osas ning *nucleus accumbens*'is avaldub *Drd1a* tugevalt P0 vanuses. Nähtud *Drd1a* ekspressioonimuster on kooskõlas kirjanduses avaldatud materjaliga *Drd1a* ekspressiooni ja dopamiinergiliste juhteteede kohta.
- *Drd1a* ekspressioon kattub suures osas *Wfs1* ekspressiooniga. Mõlemad ekspresseeruvad valdavalt kana otsaju basaalses: mediaalses ja lateraalses striatumis, amügdala piirkondades, striopallidaalses piirkonnas, haisteköbrukeses, *interpenduncular nucleus*'es, BStL-s. Kumbki geen ei ekspresseeru *globus pallidus*'es. Kattuv ekspressioonimuster võib viidata funktsionaalsele seosele nene kahe geeni produkti vahel. See on oluline lähtepunkt edasiste uuringute tarvis, et selgitada välja, kas *Wfs1*-l on roll dopamiinergiliste sünapsite funktsioneerimises.



## **The expression of *Drd1a* in the brain of domestic chick (*Gallus gallus domesticus*)**

Jaanus End

### Summary

*Drd1a* encodes protein D1A, the most intensely expressed dopamine receptor in all vertebrates (Yamamoto *et al.*, 2012). D1 (mammalian homolog of avian D1A) deficient mice are hyperactive (Missale *et al.*, 1998). Dopaminergic system is involved in motor, motivation and memory formation (Wise, 2004). There are distinguished three different dopaminergic pathways: nigrostriatal, mesocortical and tuberoinfundibular (Alttoa *et al.*, 2009; Di Chiara and Imperato, 1988; Lechan *et al.*, 1980). D1A protein is found in limbic system, hypothalamus, thalamus, *entopeduncular nucleus*'es ja *substantia nigra pars reticulata*'s (Missale *et al.*, 1998).

Expression of *Drd1a* was shown in adult and developing forebrain of domestic chick (*Gallus gallus domesticus*) in current research. The expression of *Drd1a* has been found in homologues of avian and mammalian brain. Exact results and conclusions are below:

- Most intensive expression of *Drd1a* was seen in chicks at age of E13 and E15; weakest expression was in adult. Strongest expression is in medial striatum, striopallidal area and olfactory bulb during early stage of develop and adulthood. In BstL, *nucleus accumbens*, *nidopallium* caudal part island field and lateral area the *Drd1a* expresses intensely at age of P0.
- Most intense overlay of *Drd1a* and *Wfs1* expression pattern was seen in medial striatum, striopallidal area and olfactory bulb. It can be said that two proteins activate each other in mentioned structures.

## **TÄNUSÕNAD**

Tahan tänada juhendajaid Kersti Lilleväli ja Triin Tekkot juhendamise eest käesoleva töö valmimisel. Suured tänud lähevad Triin Lakspere'le. Tänan ka teisi arengubioloogia õppetooli inimesi.

## KIRJANDUSE LOETELU

- Adolphs R, Tranel D, Damasio H, Damasio AR (1995) Fear and the human amygdala. *J Neurosci* 15: 5879-5891.
- Alntoft A, Seeman P, Koiv K, Eller M, Harro J (2009) Rats with persistently high exploratory activity have both higher extracellular dopamine levels and higher proportion of D(2) (High) receptors in the striatum. *Synapse* 63: 443-446.
- Barnea A, Nottebohm F (1994) Seasonal recruitment of hippocampal neurons in adult free-ranging black-capped chickadees. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 11217-11221.
- Bottjer SW, Brady JD, Cribbs B (2000) Connections of a motor cortical region in zebra finches: relation to pathways for vocal learning. *J Comp Neurol* 420: 244-260.
- Butler AB, Cotterill RM (2006) Mammalian and avian neuroanatomy and the question of consciousness in birds. *Biol Bull* 211: 106-127.
- Cadet JL, Jayanthi S, McCoy MT, Beauvais G, Cai NS (2010) Dopamine D1 receptors, regulation of gene expression in the brain, and neurodegeneration. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 9: 526-538.
- Callier S, Snapyan M, Le Crom S, Prou D, Vincent JD, et al. (2003) Evolution and cell biology of dopamine receptors in vertebrates. *Biol Cell* 95: 489-502.
- Campese VD, Kim J, Lazaro-Munoz G, Pena L, LeDoux JE, et al. (2014) Lesions of lateral or central amygdala abolish aversive Pavlovian-to-instrumental transfer in rats. *Front Behav Neurosci* 8: 161.
- Canto CB, Wouterlood FG, Witter MP (2008) What does the anatomical organization of the entorhinal cortex tell us? *Neural Plast* 2008: 381243.
- Casini G, Bingman VP, Bagnoli P (1986) Connections of the pigeon dorsomedial forebrain studied with WGA-HRP and 3H-proline. *J Comp Neurol* 245: 454-470.
- Casini G, Fontanesi G, Bingman VP, Jones TJ, Gagliardo A, et al. (1997) The neuroethology of cognitive maps: contributions from research on the hippocampus and homing pigeon navigation. *Arch Ital Biol* 135: 73-92.
- Colombo M, Broadbent N (2000) Is the avian hippocampus a functional homologue of the mammalian hippocampus? *Neurosci Biobehav Rev* 24: 465-484.
- Di Chiara G, Imperato A (1988) Opposite effects of mu and kappa opiate agonists on dopamine release in the nucleus accumbens and in the dorsal caudate of freely moving rats. *J Pharmacol Exp Ther* 244: 1067-1080.
- Fernandez AS, Pieau C, Reperant J, Boncinelli E, Wassef M (1998) Expression of the Emx-1 and Dlx-1 homeobox genes define three molecularly distinct domains in the

- telencephalon of mouse, chick, turtle and frog embryos: implications for the evolution of telencephalic subdivisions in amniotes. *Development* 125: 2099-2111.
- Fonseca SG, Ishigaki S, Osowski CM, Lu S, Lipson KL, et al. (2010) Wolfram syndrome 1 gene negatively regulates ER stress signaling in rodent and human cells. *J Clin Invest* 120: 744-755.
- Fonseca SG, Urano F, Weir GC, Gromada J, Burcin M (2012) Wolfram syndrome 1 and adenylyl cyclase 8 interact at the plasma membrane to regulate insulin production and secretion. *Nat Cell Biol* 14: 1105-1112.
- Gagliardo A, Ioale P, Odetti F, Bingman VP (2001) The ontogeny of the homing pigeon navigational map: evidence for a sensitive learning period. *Proc Biol Sci* 268: 197-202.
- Gerfen CR (2000) Molecular effects of dopamine on striatal-projection pathways. *Trends Neurosci* 23: S64-70.
- Gerfen CR, Engber TM (1992) Molecular neuroanatomic mechanisms of Parkinson's disease: a proposed therapeutic approach. *Neurol Clin* 10: 435-449.
- Hofmann S, Philbrook C, Gerbitz KD, Bauer MF (2003) Wolfram syndrome: structural and functional analyses of mutant and wild-type wolframin, the WFS1 gene product. *Hum Mol Genet* 12: 2003-2012.
- Inoue H, Tanizawa Y, Wasson J, Behn P, Kalidas K, et al. (1998) A gene encoding a transmembrane protein is mutated in patients with diabetes mellitus and optic atrophy (Wolfram syndrome). *Nat Genet* 20: 143-148.
- Jackson DM, Westlind-Danielsson A (1994) Dopamine receptors: molecular biology, biochemistry and behavioural aspects. *Pharmacol Ther* 64: 291-370.
- Jarvis ED, Gunturkun O, Bruce L, Csillag A, Karten H, et al. (2005) Avian brains and a new understanding of vertebrate brain evolution. *Nat Rev Neurosci* 6: 151-159.
- Jarvis ED, Mello CV (2000) Molecular mapping of brain areas involved in parrot vocal communication. *J Comp Neurol* 419: 1-31.
- Jarvis ED, Ribeiro S, da Silva ML, Ventura D, Vielliard J, et al. (2000) Behaviourally driven gene expression reveals song nuclei in hummingbird brain. *Nature* 406: 628-632.
- Jarvis ED, Smith VA, Wada K, Rivas MV, McElroy M, et al. (2002) A framework for integrating the songbird brain. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 188: 961-980.
- Kaas JH (2012) The evolution of neocortex in primates. *Prog Brain Res* 195: 91-102.
- Kebabian JW, Calne DB (1979) Multiple receptors for dopamine. *Nature* 277: 93-96.
- Koido K, Koks S, Nikopentius T, Maron E, Altmae S, et al. (2005) Polymorphisms in

- wolframin (WFS1) gene are possibly related to increased risk for mood disorders. *Int J Neuropsychopharmacol* 8: 235-244.
- Krayniak PF, Siegel A (1978) Efferent connections of the hippocampus and adjacent regions in the pigeon. *Brain Behav Evol* 15: 372-388.
- Krebs JR, Erichsen JT, Bingman VP (1991) The distribution of neurotransmitters and neurotransmitter-related enzymes in the dorsomedial telencephalon of the pigeon (*Columba livia*). *J Comp Neurol* 314: 467-477.
- Kubikova L, Wada K, Jarvis ED (2010) Dopamine receptors in a songbird brain. *J Comp Neurol* 518: 741-769.
- Lavenex PB (2000) Lesions in the budgerigar vocal control nucleus NLC affect production, but not memory, of english words and natural vocalizations. *J Comp Neurol* 421: 437-460.
- Lechan RM, Nestler JL, Jacobson S, Reichlin S (1980) The hypothalamic 'tuberoinfundibular' system of the rat as demonstrated by horseradish peroxidase (HRP) microiontophoresis. *Brain Res* 195: 13-27.
- LeDoux JE (2000) Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci* 23: 155-184.
- Lever C, Burgess N, Cacucci F, Hartley T, O'Keefe J (2002) What can the hippocampal representation of environmental geometry tell us about Hebbian learning? *Biol Cybern* 87: 356-372.
- Luuk H, Koks S, Plaas M, Hannibal J, Rehfeld JF, et al. (2008) Distribution of Wfs1 protein in the central nervous system of the mouse and its relation to clinical symptoms of the Wolfram syndrome. *J Comp Neurol* 509: 642-660.
- Martinez-Garcia F, Martinez-Marcos A, Lanuza E (2002) The pallial amygdala of amniote vertebrates: evolution of the concept, evolution of the structure. *Brain Res Bull* 57: 463-469.
- Medina L, Reiner A (2000) Do birds possess homologues of mammalian primary visual, somatosensory and motor cortices? *Trends Neurosci* 23: 1-12.
- Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG (1998) Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 78: 189-225.
- Monk CS, Grillon C, Baas JM, McClure EB, Nelson EE, et al. (2003) A neuroimaging method for the study of threat in adolescents. *Dev Psychobiol* 43: 359-366.
- Muglia LM, Schaefer ML, Vogt SK, Gurtner G, Imamura A, et al. (1999) The 5'-flanking region of the mouse adenylyl cyclase type VIII gene imparts tissue-specific expression in transgenic mice. *J Neurosci* 19: 2051-2058.
- Nicol X, Muzerelle A, Bachy I, Ravary A, Gaspar P (2005) Spatiotemporal localization of the

- calcium-stimulated adenylate cyclases, AC1 and AC8, during mouse brain development. *J Comp Neurol* 486: 281-294.
- O'Keefe J, Burgess N (1996) Geometric determinants of the place fields of hippocampal neurons. *Nature* 381: 425-428.
- Osman AA, Saito M, Makepeace C, Permutt MA, Schlesinger P, et al. (2003) Wolframin expression induces novel ion channel activity in endoplasmic reticulum membranes and increases intracellular calcium. *J Biol Chem* 278: 52755-52762.
- Pitkanen A, Stefanacci L, Farb CR, Go GG, LeDoux JE, et al. (1995) Intrinsic connections of the rat amygdaloid complex: projections originating in the lateral nucleus. *J Comp Neurol* 356: 288-310.
- Probst WC, Snyder LA, Schuster DI, Brosius J, Sealfon SC (1992) Sequence alignment of the G-protein coupled receptor superfamily. *DNA Cell Biol* 11: 1-20.
- Puelles L, Kuwana E, Puelles E, Bulfone A, Shimamura K, et al. (2000) Pallial and subpallial derivatives in the embryonic chick and mouse telencephalon, traced by the expression of the genes *Dlx-2*, *Emx-1*, *Nkx-2.1*, *Pax-6*, and *Tbr-1*. *J Comp Neurol* 424: 409-438.
- Rebec GV, Grabner CP, Johnson M, Pierce RC, Bardo MT (1997) Transient increases in catecholaminergic activity in medial prefrontal cortex and nucleus accumbens shell during novelty. *Neuroscience* 76: 707-714.
- Reiner A, Medina L, Veenman CL (1998) Structural and functional evolution of the basal ganglia in vertebrates. *Brain Res Brain Res Rev* 28: 235-285.
- Reiner A, Perkel DJ, Bruce LL, Butler AB, Csillag A, et al. (2004) Revised nomenclature for avian telencephalon and some related brainstem nuclei. *J Comp Neurol* 473: 377-414.
- Rigoli L, Lombardo F, Di Bella C (2011) Wolfram syndrome and *WFS1* gene. *Clin Genet* 79: 103-117.
- Savasta M, Dubois A, Scatton B (1986) Autoradiographic localization of D1 dopamine receptors in the rat brain with [<sup>3</sup>H]SCH 23390. *Brain Res* 375: 291-301.
- Schumann CM, Bauman MD, Amaral DG (2011) Abnormal structure or function of the amygdala is a common component of neurodevelopmental disorders. *Neuropsychologia* 49: 745-759.
- Scott SK, Young AW, Calder AJ, Hellawell DJ, Aggleton JP, et al. (1997) Impaired auditory recognition of fear and anger following bilateral amygdala lesions. *Nature* 385: 254-257.
- Sparta DR, Smithuis J, Stamatakis AM, Jennings JH, Katak PA, et al. (2014) Inhibition of projections from the basolateral amygdala to the entorhinal cortex disrupts the acquisition of contextual fear. *Front Behav Neurosci* 8: 129.

- Stoof JC, Kebabian JW (1984) Two dopamine receptors: biochemistry, physiology and pharmacology. *Life Sci* 35: 2281-2296.
- Striedter GF, Vu ET (1998) Bilateral feedback projections to the forebrain in the premotor network for singing in zebra finches. *J Neurobiol* 34: 27-40.
- Sun Z, Reiner A (2000) Localization of dopamine D1A and D1B receptor mRNAs in the forebrain and midbrain of the domestic chick. *J Chem Neuroanat* 19: 211-224.
- Surmeier DJ, Ding J, Day M, Wang Z, Shen W (2007) D1 and D2 dopamine-receptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal medium spiny neurons. *Trends Neurosci* 30: 228-235.
- Surmeier DJ, Song WJ, Yan Z (1996) Coordinated expression of dopamine receptors in neostriatal medium spiny neurons. *J Neurosci* 16: 6579-6591.
- Swift M, Swift RG (2005) Wolframin mutations and hospitalization for psychiatric illness. *Mol Psychiatry* 10: 799-803.
- Takeda K, Inoue H, Tanizawa Y, Matsuzaki Y, Oba J, et al. (2001) WFS1 (Wolfram syndrome 1) gene product: predominant subcellular localization to endoplasmic reticulum in cultured cells and neuronal expression in rat brain. *Hum Mol Genet* 10: 477-484.
- Takei D, Ishihara H, Yamaguchi S, Yamada T, Tamura A, et al. (2006) WFS1 protein modulates the free Ca(2+) concentration in the endoplasmic reticulum. *FEBS Lett* 580: 5635-5640.
- Tekko T, Lillevali K, Luuk H, Sutt S, Truu L, et al. (2014) Initiation and developmental dynamics of Wfs1 expression in the context of neural differentiation and ER stress in mouse forebrain. *Int J Dev Neurosci* 35: 80-88.
- Treves A, Tashiro A, Witter MP, Moser EI (2008) What is the mammalian dentate gyrus good for? *Neuroscience* 154: 1155-1172.
- Van den Heuvel DM, Pasterkamp RJ (2008) Getting connected in the dopamine system. *Prog Neurobiol* 85: 75-93.
- Vargas JP, Petruso EJ, Bingman VP (2004) Hippocampal formation is required for geometric navigation in pigeons. *Eur J Neurosci* 20: 1937-1944.
- Vates GE, Broome BM, Mello CV, Nottebohm F (1996) Auditory pathways of caudal telencephalon and their relation to the song system of adult male zebra finches. *J Comp Neurol* 366: 613-642.
- Wild JM (1993) The avian nucleus retroambigualis: a nucleus for breathing, singing and calling. *Brain Res* 606: 319-324.
- Wild JM (1994) The auditory-vocal-respiratory axis in birds. *Brain Behav Evol* 44: 192-209.
- Wise RA (2004) Rewards wanted: Molecular mechanisms of motivation. *Discov Med* 4: 180-

Yamamoto DJ, Zahniser NR (2012) Differences in rat dorsal striatal NMDA and AMPA receptors following acute and repeated cocaine-induced locomotor activation. PLoS One 7: e37673.

Raamatud:

Andersen jt., Per (2007). The Hippocampus Book. Oxford University press.

Balaban, E., Edelman, S., Grillner, S., Grodzinski, U., Jarvis, E.D., Kaas, J.H., Laurent, G., Pipa, G. (2010) In: Dynamic Coordination in the Brain: From neurons to mind. Malsburg, C von der, Phillips, W.A., Singer, W. (eds). Strungmann Forum Reports. Lupp. J. (series Ed.) MIT Press, Cambridge MA. 59-82

Butler, A.B., Hodos, W. (2005) Comparative Vertebrate Neuroanatomy: Evolution and Adaption, second edition, Wiley.

Karten, H.J. and Hodos, W. (1967) A Stereotaxic Atlas of the Brain of the Pigeon (*Columbia livia*). Baltimore, MD: The Johns Hopkins Press.



## **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, Jaanus End (14.09.1986),

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

*Drd1a* ekspressioon kodukana (*Gallus gallus domesticus*) ajus,  
mille juhendajad on Kersti Lilleväli ja Triin Tekko

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates 27.05.2017 kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 27. mail 2014